

28jun05 00:27:05 User015070 Session D11166.1
Sub account: SAEG184.001APC-CSP

FILE CONSEJO.DOC

SYSTEM:OS - DIALOG OneSearch

File 351:Derwent WPI 1963-2005/UD,UM &UP=200540
(c) 2005 Thomson Derwent
*File 351: For more current information, include File 331 in your search.
Enter HELP NEWS 331 for details.
File 345:Inpadoc/Fam.& Legal Stat 1968-2005/UD=200525
(c) 2005 EPO

Set Items Description

3/7/1 (Item 1 from file: 351)
DIALOG(R)File 351:Derwent WPI
(c) 2005 Thomson Derwent. All rts. reserv.

013180878

WPI Acc No: 2000-352751/*200031*

Region-specific acylation of saccharose secondary hydroxyl for use in food and cosmetic industries, involves reacting saccharose with vinyl ester of fatty acid, in organic solvent, in presence of lipase
Patent Assignee: CONSEJO SUPERIOR INVESTIGACIONES CIENTIF (CNSJ)

Number of Countries: 001 Number of Patents: 002

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	Week
ES 2141670	A1	20000316	ES 972602	A	19971215	200031 B
ES 2141670	B1	20001101	ES 972602	A	19971215	200066

Priority Applications (No Type Date): ES 972602 A 19971215

Patent Details:

Patent No	Kind	Lan Pg	Main IPC	Filing Notes
ES 2141670	A1	1	C12P-007/62	
ES 2141670	B1		C12P-007/62	

Abstract (Basic): ES 2141670 A

NOVELTY - A process for the region-specific acylation of saccharose secondary hydroxyl, is new and is based on reacting saccharose with vinyl ester of fatty acid, in organic solvent medium, in presence of lipase of filament fungus, preferably in immobilized form, and produces surfactants of chemical structure different from those obtained industrially (from the pure chemical point of view (with no assistance of the enzyme) the primary hydroxyl groups of saccharose are most reactive of its hydroxyl groups).

USE - The products can be used in pharmaceutical, cosmetic, food and detergent production industries.

ADVANTAGE - The process is simple and allows selective specific acylation of secondary hydroxyl of saccharose.

Dwg.0/0

Derwent Class: B03; D13; D16; D21; D25; E13

International Patent Class (Main): C12P-007/62

International Patent Class (Additional): C07H-013/06; C12P-019/44

Best Available Copy

28jun05 00:29:25 User015070 Session D11166.2
Sub account: SAEG184.001APC-CSP

\$20.30 Estimated total session cost 0.083 Hrs.

Status: Signed Off. (4 minutes)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 141 670**

(21) Número de solicitud: **009702602**

(51) Int. Cl.⁶: **C12P 7/62**

C12P 19/44

C07H 13/06

(12)

SOLICITUD DE PATENTE

A1

(22) Fecha de presentación: **15.12.1997**

(43) Fecha de publicación de la solicitud: **16.03.2000**

(43) Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
16.03.2000

(71) Solicitante/s: **Consejo Superior de
Investigaciones Científicas
Serrano, 117
28006 Madrid, ES**

(72) Inventor/es: **Plou Gasca, Francisco José;
Pastor Martínez, Eitel;
Cruces Villalobos, María Angeles;
Ferrer Martínez, Manuel y
Ballesteros Olmo, Antonio**

(74) Agente: **No consta**

(54) Título: **Procedimiento para la acilación específica enzimática de un hidroxilo secundario de la sacarosa.**

(57) Resumen:

Procedimiento para la acilación específica enzimática de un hidroxilo secundario de la sacarosa. Es un procedimiento enzimático para la acilación regioespecífica de un hidroxilo secundario de la sacarosa. En esencia, consiste en hacer reaccionar la sacarosa con el éster vinílico de un ácido graso en un disolvente orgánico, en presencia de una lipasa de un hongo filamentoso, preferiblemente inmovilizada. Permite obtener tensioactivos con una estructura química distinta a los obtenidos industrialmente (químicamente los hidroxilos más reactivos son los primarios). Además, se trata de un proceso notablemente más sencillo para la acilación específica de un hidroxilo secundario de la sacarosa. Aplicaciones en farmacia, cosmética, alimentación y detergentes.

ES 2 141 670 A1

DESCRIPCION

Procedimiento para la acilación específica enzimática de un hidroxilo secundario de la sacarosa.

Sector de la técnica

Farmaceútico, Cosmética, Alimentación, Industria de los Detergentes. Tensioactivos no iónicos.

Estado de la técnica

Los ésteres de carbohidratos son compuestos de extraordinario interés debido a sus numerosas aplicaciones, entre las que destacan: a) alimentación (emulgentes, edulcorantes, espumantes, retardadores de la maduración de frutas, sustitutos de grasas); b) composiciones de detergentes; c) productos intermedios en Química y Farmacia; d) Cosmética; e) son excelentes inhibidores bacterianos. Las propiedades de estos compuestos dependen de varios factores: a) del carbohidrato en particular; b) de la longitud de cadena del ácido graso y de la presencia o ausencia de insaturaciones; c) de la estructura química del compuesto (posición de acilación).

La sacarosa es el compuesto orgánico obtenido en mayor cantidad y pureza en el mundo (la producción anual ronda los 110-120 millones de toneladas). Aproximadamente el 95% de los ésteres de sacarosa sintetizados se utilizan en la industria de la alimentación. La sacarosa contiene 3 hidroxilos primarios ($6\text{-OH}, 1\text{-OH}$) y 5 secundarios. La acilación química tiene lugar casi exclusivamente en los OH primarios según el orden $6\text{-OH} > 6'\text{-OH} > 1\text{-OH}$ [Haines, A.H. *Adv Carbohydr. Chem. Biochem.* **33**, 11-109 (1976)]. Sin embargo, la acilación de los OH secundarios se encuentra muy desfavorecida. Los ésteres de sacarosa se sintetizan industrialmente mediante transesterificación del éster metílico de un ácido graso a sacarosa en presencia de un catalizador básico, obteniéndose mezclas de ésteres primarios. Para la acilación selectiva de los hidroxilos secundarios en sacarosa es necesario, en primer lugar, bloquear los OH primarios, llevar a cabo la acilación química, y finalmente desproteger los hidroxilos primarios [A.H. Haines, *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **39**, 13-70 (1981)]. Tan solo en un caso se ha descrito la acilación específica de un hidroxilo secundario en sacarosa sin necesidad de proteger los OH primarios [Chauvin, C., Bacsko, K. Plusquellec, D. *J. Org. Chem.* **58**, 3495-3498 (1993)]. No obstante para ello es necesario utilizar electrófilos especiales y de difícil síntesis (3-aciltiazolidina-2-iones) en presencia de una base fuerte (hidruro sódico) con el fin de activar el hidroxilo más ácido (el 2-OH del anillo de glucosa) hacia la formación de alcóxido (más nucleofílico).

El descubrimiento de que los enzimas son capaces de funcionar en medios no acuosos ha hecho posible que se utilicen para catalizar eficientemente procesos de síntesis. Los enzimas son útiles en transformaciones regioselectivas de mono- y disacáridos, incluyendo reacciones de acilación [Carrea, G., Riva, S., Secundo, F., Danieli, B. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I.*, 1057-1061 (1989)], desacilaciones [Kloosterman, M., Weijnen, J.G.J., de Vries, N.K., Mentch, J., Caeron, I., Descotes, G., Schoemaker, H.E., Meijer,

E.M. *J. Carbohydr. Chem.* **8**, 693-704 (1989)] y reacciones de oxidación [Root, R.L., Durrwachter, J.R., Wong, C.H. *J. Am. Chem. Soc.* **107**, 2297 (1985)].

Dado que la sacarosa es soluble en un número muy limitado de disolventes orgánicos dimetilformamida, dimetilacetamida, dimetilsulfóxido, piridina morfolina, principalmente), y que la mayoría de los enzimas son inestables en dichos medios, el rango de disolventes para acilar este disacárido es bastante restringido. A pesar de estas dificultades se ha sido descrito la acilación enzimática en la posición 1-(del anillo de fructosa) utilizando subtilisina o serín-proteasas de dicha familia [Cruces, M.A., Otero, C., Bemabe, M., Martín-Lomas, M., Ballesteros, A. *annals N.Y. Acad Sci.* **672**, 436-443 (1992); Soedjak H.S., Spradlin, J.E. *Biocatalysis* **11**, 241-248 (1994); Patil, D.R., Rethwisch, D.G., Dordick, J.S. *Biotechnol. Bioeng.* **37**, 639-646 (1991)], o en el hidroxilo primario 6-OH (del anillo de glucosa) con la lipasa de *Pseudomonas sp.* [Dordick J.S., Hacking, A.J., Km, R.A. (1988) GB Patent Appl. No. 8822673.; Rich, J.O., Bedell, B.A., Dordick J.S. *Biotechnol. Bioeng.* **45**, 426-434 (1995)].

No obstante, la acilación enzimática de los hidroxilos secundarios de este disacárido sólo se ha descrito como una reacción muy minoritaria en comparación con la formación de ésteres primarios [Soedjak, H.S., Spradlin, J.E. *Biocatalysis* **11**, 241-248 (1994)]. Tampoco se ha logrado la acilación enzimática directa de hidroxilos secundarios en otros momo- y disacáridos, siendo necesario recurrir a métodos enzima-químicos. Así, por ejemplo, para la acilación de los hidroxilos 2-OH y 3-OH de glucosa es necesario proteger el 6-OH por vía química, seguidamente la hexosa protegida se hace reaccionar el azúcar bloqueado con el agente acilante en presencia de una lipasa y finalmente se desbloquea el éster primario [Theirsod, M., Klibanov, A.M. *J. Am. Chem. Soc.* **108**, 5638-5640 (1986)].

Breve descripción de la invención

La presente invención recoge un procedimiento para la acilación regioespecífica de un hidroxilo secundario de la sacarosa. En esencia, consiste en hacer reaccionar la sacarosa con el éster vinílico de un ácido graso en un disolvente orgánico, en presencia de la lipasa de un hongo filamentoso (de los géneros *Fusarium*, *Penicillium*, *Trichoderma* y *Hemicola*). El producto obtenido es mayoritariamente monolaurato de sacarosa (mezcla de los distintos regiosómeros), siendo el más abundante (>75% del total) el éster acilado en el hidroxilo secundario 2-OH del anillo de glucosa.

Descripción detallada de la invención

Se prepara una solución de sacarosa en un disolvente hidrofílico con gran densidad de puentes de hidrógeno (dimetilformamida, dimetilacetamida, piridina, preferiblemente dimetilsulfóxido). Se añade éster vinílico de ácido graso (de 12-16 carbonos) como agente acilante en una relación molar respecto de sacarosa entre 4:1 y 1:4, obteniéndose, en función del disolvente elegido, y del ácido graso, una solución o una emulsión. La mezcla se calienta a una temperatura entre 30 y 65°C., y se añade la lipasa de un hongo filamentoso (de los géneros *Fusarium*, *Penicillium*,

Trichoderma y preferiblemente *Humicola*) en una cantidad entre 30-150 mg biocatalizador/ml. de solución. El encima es preferiblemente añadirlo en estado inmovilizado (en soportes inorgánicos como sílice o alúmina, o sobre polímeros acrílicos funcionalizados). El sistema se mantiene con agitación el tiempo necesario para la formación de los productos.

La mezcla de reacción se filtra en una placa filtrante, y se lava con el disolvente orgánico empleado. El enzima puede ser reutilizado (manteniendo prácticamente su actividad inicial) mediante lavado con tampón fosfato, y seguidamente se seca bien mediante corriente de aire o por lavado con mezclas acetona: fosfato en proporciones superiores a 9:1. La mezcla de reacción contiene, en función de las condiciones, mayoritariamente monoéster de sacarosa y una pequeña proporción de ésteres superiores (fundamentalmente diésteres). El monoéster se purifica por cromatografía de columna en gel de sílice. La fracción de monoéster de sacarosa contiene diversos isómeros posicionales pero mayoritariamente 2-O-acilsacarosa, en proporción superior al 75 % respecto al resto de los isómeros.

Ejemplos

Ejemplo 1

Se pesan 0.5 g de sacarosa y se disuelven en 5 mL de dimetilsulfóxido. La solución se calienta a 40°C., y se añaden 1.56 ml de laurato de vinilo (relación molar 1.5:1). La emulsión formada se agita magnéticamente a 300 rpm, y se añaden 750 mg. de biocatalizador (lipasa de *Humicola lanuginosa* inmovilizada, preferiblemente, sobre un polímero acrílico). La mezcla se incuba durante seis horas con agitación, tras lo cual se enfriá, se filtra y se lava con 5 ml de dimetilsulfóxido. En estas condiciones se obtiene una conversión del 70 % (referido a la fracción de sacarosa convertida a productos). El producto contiene un 90 % de monolaurados de sacarosa, y el 10 % restante corresponde a ésteres superiores (principalmente diésteres). La determinación de las concentraciones de los productos se llevó a cabo por cromatografía gas-líquido, con una columna capilar de difenilsilicona (15 mm x 0.25 mm), con detección por ionización de llama. El biocatalizador puede ser recuperado mediante un proceso en dos etapas: 1) lavado con 100 ml. de tampón fosfato 10 mM (pH 8.0); 2) lavado con una mezcla acetona/tampón fosfato, en proporción volumétrica 20/1.

La mezcla de reacción se purifica por cromatografía de columna en gel de sílice (0.06-0.2 mm, 70-230 mesh), utilizando como eluyentes acetato de etilo (para la eliminación del donador de acilo) y acetato de etilo:metanol:agua 17:2:1 (para los

productos de reacción). La fracción de monolauratos de sacarosa (0.45 g) contiene un 75 % del éster 2-O-laurilsacarosa (asignado mediante ¹H-RMN y experimentos de correlación múltiple 2D-¹H-¹³C), siendo el resto pequeñas cantidades de los distintos isómeros posicionales.

En los ejemplos que se detallan a continuación se estudia el efecto de la relación molar donador de acilo: sacarosa, del medio de reacción, de la temperatura y de la longitud de cadena del ácido graso.

Ejemplo 2

En las mismas condiciones que el ejemplo 1, se añaden 0.58 mL de laurato de vinilo (relación molar laurato de vinilo: sacarosa 1.5:1). Para obtener la misma conversión que en el ejemplo 1 (aprox. 70 %) es necesario mantener la reacción tan solo 1 hora. El producto obtenido es básicamente monolaurato de sacarosa, con una selectividad del 78 % hacia 2-O-laurilsacarosa.

Ejemplo 3

En las mismas condiciones que el ejemplo 1, pero utilizando dimetilformamida como medio de reacción. En estas condiciones es necesario material la reacción 24 horas para obtener una conversión del 70 %. El producto obtenido está formado por un 75 % de monolaurato de sacarosa, y un 25 % de ésteres superiores. La selectividad hacia la formación de 2-O-laurilsacarosa disminuye hasta el 50 %.

Ejemplo 4

En las mismas condiciones que el ejemplo 2, pero llevando a cabo la reacción a 60°C. Parando la reacción en tan solo 15 minutos, se obtiene una conversión del 75 %. El producto obtenido contiene un 82 % de monoésteres de sacarosa (de los que un 80 % es 2-O-laurilsacarosa), y un 18 % de ésteres superiores.

Ejemplo 5

Se pesan 0.5 g. de sacarosa y se disuelven en 5 mL de dimetilacetamida. La solución se calienta a 40°C. y se añaden 1.69 g. de palmitato de vinilo (relación molar 4:1). La emulsión formada se agita magnéticamente a 300 rpm., y se añaden 100 mg. De lipasa de *Humicola* adsorbida, preferiblemente, sobre tierra de infusorios. La mezcla se incuba durante 5 días con agitación, tras lo cual se enfriá, se filtra y se lava con 5 mL de dimetilacetamida. En estas condiciones se obtiene una conversión del 67 % (referido a la fracción de sacarosa convertida a productos). El producto obtenido es básicamente monopalmitato de sacarosa, y en dicha fracción el número más abundante es 2-O-palmitoil-sacarosa, con una selectividad del 84 % respecto al resto de isómeros posicionales.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la acilación específica enzimática de un hidroxilo secundario de la sacarosa caracterizado porque la acilación se produce haciendo reacción la sacarosa con el éster vinílico de un ácido graso en un disolvente orgánico, en presencia de la lipasa de un hongo filamentoso (de los géneros *Fusarium*, *Penicillium*, *Trichoderma* y *Humicola*).

2. Procedimiento según reivindicación 1 caracterizado por las siguientes etapas:

- a) Preparación de una solución de sacarosa en un disolvente hidrofílico con gran densidad de puentes de hidrógeno (dimetilsorbitan, dimetilacetamida, piridina, preferiblemente dimetilsulfóxido).
- b) Se añade éster vinílico de ácido graso (de 12-16 carbonos) como agente acilante en una relación molar respecto de sacarosa entre 4:1 y 1:4, obteniéndose, en función del disolvente elegido y del ácido graso, una solución

o una emulsión.

c) La mezcla se calienta a una temperatura entre 30 y 65°C, y se añade la lipasa del hongo filamentoso, (de los géneros *Fusarium*, *Penicillium*, *Trichoderma* y preferiblemente *Humicola*) en una cantidad entre 30-150 mg. Biocatalizador/ml de solución. El enzima es preferible, añadirlo en estado inmovilizado (en soportes inorgánicos como silice o alúmina, o sobre polímeros acrílicos funcionalizados). El sistema se mantiene con agitación el tiempo necesario para la formación de los productos.

d) La mezcla de la reacción se filtra en una placa filtrante, y se lava con el disolvente orgánico empleado. El enzima puede ser reutilizado (manteniendo prácticamente su actividad inicial) mediante lavado con tampon fosfato, y seguidamente se seca bien mediante corriente de aire o por lavado con mezclas, acetona: fosfato, en proporciones superiores a 9:1.

25

30

35

40

45

50

55

60

65



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA

⑪ ES 2 141 670

⑯ N.º solicitud: 009702602

⑰ Fecha de presentación de la solicitud: 15.12.1997

⑲ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑳ Int. Cl.⁶: C12P 7/62, 19/44, C07H 13/06

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	EP 0413307 A1 (LION CORPORATION) 20.09.1991, todo el documento.	1,2
A	BASE DE DATOS HCAPLUS en STN, Columbus, Ohio, USA, AN 1985:94315. HAJIME, S. et al.: "Enzymic synthesis of carbohydrate esters of fatty acid (I) esterification of sucrose, glucose, fructose and sorbitol", J. Amer. Oil Chem. Soc. (1984), 61 (11), páginas 1761-1765, resumen.	1,2
A	BASE DE DATOS WPI, semana 199737, Londres, Derwent Publications Ltd., AN 1997-397039 & JP 09-173091 A (LION CORP.) 08.07.1997, resumen.	1,2
A	BASE DE DATOS WPI, semana 199721, Londres, Derwent Publications Ltd., AN 1997-231184 & JP 09-071594 A (MITSUBISHI CHEM CORP) 18.03.1997, resumen.	1,2
A	BASE DE DATOS WPI, semana 199538, Londres, Derwent Publications Ltd., AN 1995-287977 & JP 07-184672 A (FUJI SEIYU KK) 25.07.1995, resumen.	1,2

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia
Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría
A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita
P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud
E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado
 para todas las reivindicaciones para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe 11.02.2000	Examinador A. Maquedaño Herrero	Página 1/1
---	---	----------------------

Best Available Copy